

13. Rodolfo NEGRI. — Alterazioni morfologiche dei germi sulforafeno-sensibili viste al microscopio ottico ed elettronico.

Riassunto — L'A. descrive alcune alterazioni morfologiche dei germi sensibili al « sulforafene » viste con gli usuali mezzi di microscopia e con il microscopio elettronico.

Résumé. — L'Auteur décrit quelques altérations morphologiques des germes sensibles au « sulforaphène », examinées avec les moyens usuels de microscopie et avec le microscope électronique.

Summary. — The Author describes some morphologic alterations in germs sensitive to « sulphoraphene » which can be observed with a normal or with an electronic microscope.

Zusammenfassung. — Verf. beschreibt einige morphologische Änderungen der Sativinempfindlichen Keime während der Untersuchung mit den gebräuchlichen Hilfsmitteln der Mikroskopie und mit dem Elektronenmikroskop.

In una mia nota preliminare ⁽¹⁾ ho messo in evidenza che i semi di *Raphanus sativus* L., var. *radicula* Pers., contenevano una sostanza ad azione antibiotica particolarmente attiva verso i germi gram-negativi, alla quale era stato proposto il nome di « sativina ». In una nota successiva fatta in collaborazione ⁽²⁾ veniva caratterizzata e definita detta sostanza che risultava essere un senfolo simile al « sulforafene » isolato da SCHMIDT e KARRER ⁽³⁾, al quale è dovuta l'azione antibiotica. Stabilito ciò ho creduto opportuno studiare le eventuali alterazioni morfologiche dei principali germi sensibili a questo nuovo antibiotico onde poter trarre osservazioni sul meccanismo d'azione del « sulforafene ». Tale studio è stato fatto sia coi comuni mezzi di microscopia che col microscopio elettronico.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO NORMALE.

Per tali ricerche mi sono attenuto alla tecnica usata da numerosi ricercatori per studiare le alterazioni morfologiche dei germi sia in fase biotica che anabiotica (germi in riposo) ai più comuni antibiotici ⁽⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁻¹³⁾. I germi usati per tali ricerche sono: il *V. Cholerae* « Inaba »,

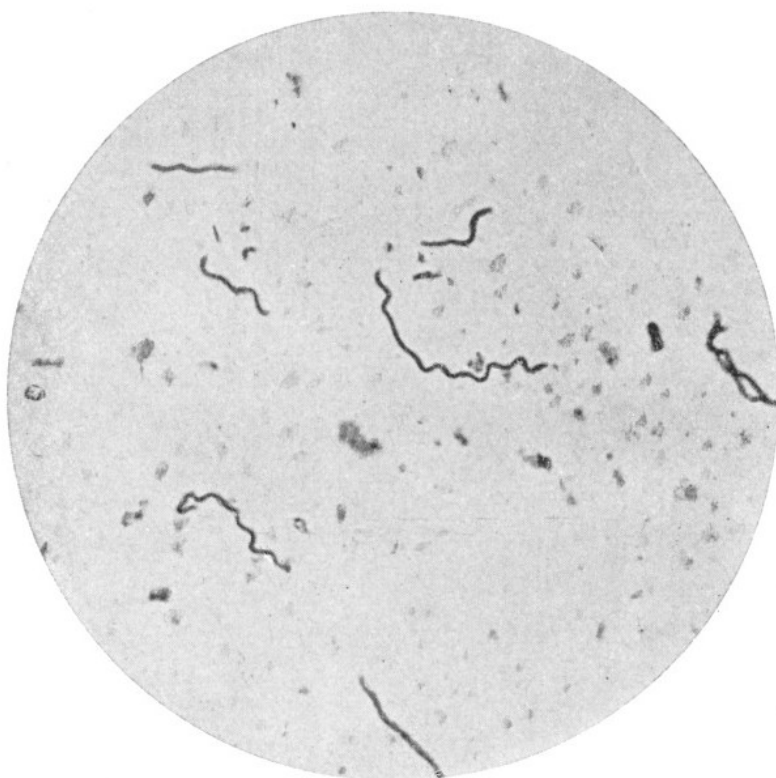


Fig. 1 — *V. Cholerae* « *Inaba* » - Brodocoltura di 24 h. con aggiunta di dose sub-inibente di sulforafene. Forme « giganti » accanto ad elementi di normale grandezza (microscopio ottico: 1.000 ingrandimenti)

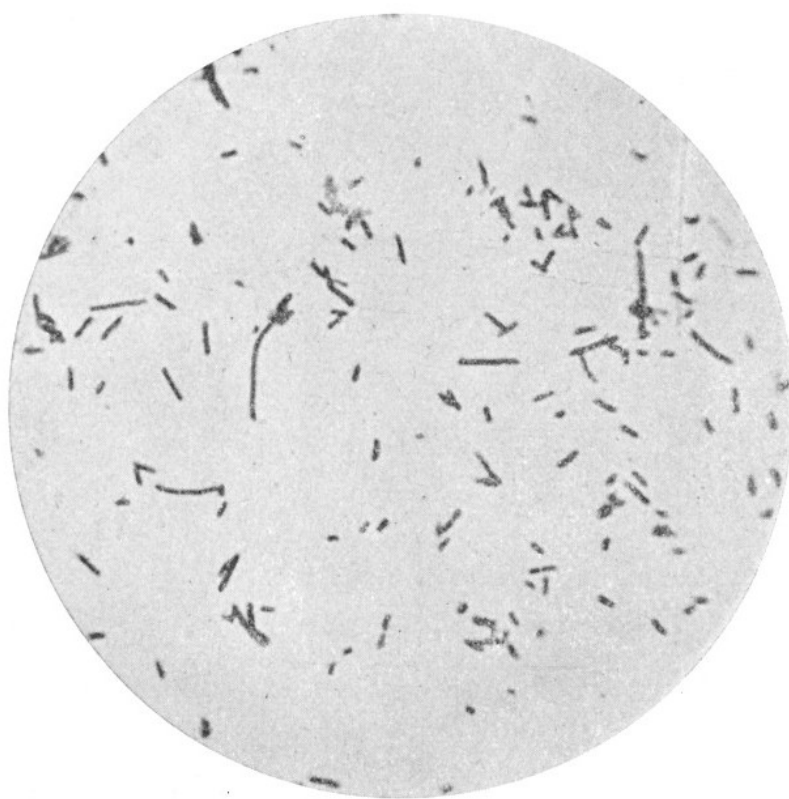


Fig. 2 — *S. typhi* O - Brodocoltura di 24 h. con aggiunta di sulforafene in dose sub-inibente. Forme « giganti » accanto ad elementi di normale grandezza (microscopio ottico: 1.000 ingrandimenti)

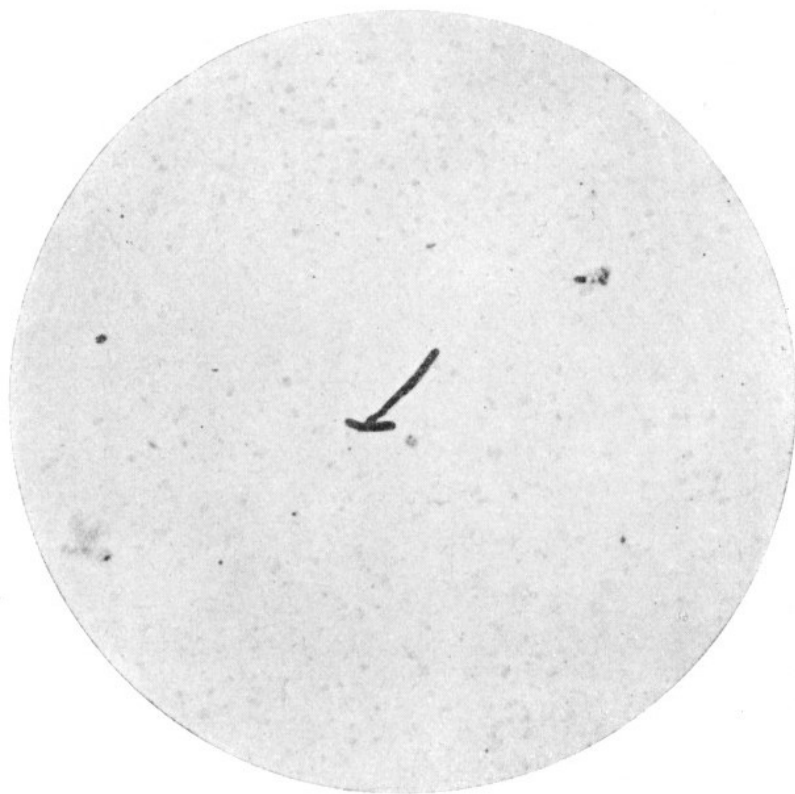


Fig. 3 — *S. Schott-Müller* - Brodocoltura di 24 h. con aggiunta di dose sub-inibente di sulforafene. Forme « giganti » accanto ad elementi di normale grandezza (microscopio ottico: 1.000 ingrandimenti)



Fig. 4 — *S. paratyphy A* - Brodocoltura di 24 h. con aggiunta di dosi sub-inibenti di sulforafene. Forme « giganti » con protoplasma vacuolato, accanto ad elementi di normale grandezza (microscopio ottico: 1.000 ingrandimenti)



Fig. 5 — *B. Coli* - Brodocoltura di 24 h. con aggiunta di dose sub-inibente di sulforafene. Forme « giganti » accanto ad elementi di normale grandezza (microscopio ottico: 1.000 ingrandimenti)



Fig. 6 — *Shighella dysenteriae* - Brodocoltura di 24 h. con aggiunta di dose sub-inibente di sulforafene. Forme « giganti » accanto ad elementi di normale grandezza (microscopio ottico: 1.000 ingrandimenti)

la *S. typhi* O, la *S. Schott-Müller*, la *S. paratyphi* A, il *B. coli*, la *Shigella dysenteriae*, tutti della collezione dell'Istituto Superiore di Sanità.

Per mettere in evidenza eventuali alterazioni morfologiche di tali germi, ho insemato provette contenenti 4,5 cc. di brodo di carne con una goccia di brodocoltura di 24h. di ogni germe sopra citato e mezzo cc. di una soluzione acquosa contenente 200 γ di sulforafene. Tale quantità è risultata, in seguito a diverse prove, dose sub-inibente e cioè capace di provocare un ritardo di sviluppo dei germi cimentati. Dopo 24h. di termostato a 37° C. e dopo aver controllato il ritardo di sviluppo del germe con opportuni controlli senza l'aggiunta di sulforafene, centrifugavo la brodocoltura per mezz'ora a 3.000 giri; dal tenue sedimento eseguivo strisci colorandoli col metodo del GRAM. Le alterazioni morfologiche dei germi da me studiati sono messe in evidenza dalle figg. 1-2-3-4-5-6, in cui si notano accanto a germi di grandezza normale, numerose forme aumentate di volume « in toto », ma soprattutto in lunghezza (forme così dette « giganti »). In quasi tutti i germi era possibile mettere in evidenza — coi comuni apparecchi di microscopia — numerosi vacuoli rifrangenti. Sono state fatte colorazioni con Sudan III per stabilire se tali formazioni vacuolari fossero di sostanza grassa, ma non si ottenne mai la caratteristica colorazione dei lipoidi.

Per studiare l'azione del « sulforafene » sui germi in fase anabiotica (germi in riposo), mi sono attenuto alla tecnica di CARLINFANTI (8). Anche per questo antibiotico si è potuto rilevare che esso non ha nessuna azione sui germi « in riposo » e l'osservazione microscopica mise in evidenza solo un impiccolimento del corpo batterico dovuto probabilmente alle condizioni di stasi metabolica nella quale si trovavano i germi.

Si è così potuto dimostrare che dosi sub-inibenti di « sulforafene » producono alterazioni morfologiche nei germi sensibili e in fase biotica, rilevabili anche coi comuni mezzi di microscopia, mentre non provocano nessuna alterazione morfologica sui medesimi germi in fase anabiotica.

OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO.

Per tale studio mi sono servito del solo ceppo di *V. Cholerae* « Inaba », germe molto sensibile al « sulforafene ». La dose di 200 γ di tale sostanza è stata considerata sub-inibente per tale germe. La tecnica da me usata per l'osservazione al microscopio elettronico è quella descritta da PENSO-SCANGA (14). Come controllo veniva usato, con la stessa tecnica, una eguale coltura di *V. cholerae* senza l'aggiunta di « sulforafene ». Le osservazioni al microscopio elettronico sono state fatte con colture di 6-12-24 h. e si possono riassumere come segue:

I) Le colture di 6 h. di *V. cholerae* (senza aggiunta di sulforafene) mostrano, accanto ad individui normali (fig. 7), individui allungati a proto-

plasma omogeneo e compatto; la membrana pericellulare non è visibile; solo qualche forma presenta schiarimenti ai poli del corpo batterico dove si intravede la membrana pericellulare ma non il ciglio (fig. 8).

Le colture di 6 h. di *V. Cholerae* — trattate con dosi sub-inibenti di sulforafene (200 γ) mostrano per lo più individui allungati ed ingrossati, con protoplasma ancora compatto ed omogeneo; la membrana pericellulare non è visibile mentre è bene evidente il ciglio (fig. 9).

II) Le colture di 12 h. di *V. Cholerae* (senza aggiunta di « sulforafene ») mostrano individui con le stesse caratteristiche morfologiche di quelli di 6 h., ma sono in genere più corti.

— Le colture di 12 h. di *V. Cholerae* trattate con la solita dose sub-inibente di « sulforafene », mostrano — accanto ad individui di grandezza normale, con protoplasma ancora compatto ed omogeneo — numerosissimi individui allungati ed ingrossati (forme giganti), a protoplasma compatto, omogeneo, a margini netti, per cui non è visibile la membrana pericellulare (fig. 10).

III) Le colture di 24 h. di *V. Cholerae* (senza sulforafene) mostrano per lo più individui di dimensioni diverse, il cui protoplasma è però omogeneo, a margini irregolari e sfumati; appena visibile la membrana pericellulare (fig. 11).

— Le colture di 24 h. di *V. Cholerae*, in presenza della solita dose sub-inibente dell'antibiotico in questione, mostrano individui di dimensioni diverse con tipiche alterazioni morfologiche; accanto ad individui a protoplasma poco omogeneo, specie al centro del corpo batterico, e con addensamento protoplasmatico bipolare, si rilevano germi allungati di cui un solo estremo è occupato da protoplasma addensato ed omogeneo, mentre l'altro polo batterico si presenta « svuotato », attraversato da numerose lacinie che uniscono il protoplasma alla membrana pericellulare che è bene evidente (figura 12). Si rilevano inoltre ancora delle « forme giganti », con protoplasma omogeneo, messo in evidenza già nelle colture di *V. Cholerae* di 12 h. e trattate con dosi sub-inibenti di « sulforafene ».

IV) L'osservazione al microscopio elettronico, fatta dopo 24 h., di germi del colera, sospesi in soluzione fisiologica e con l'aggiunta di dosi sub-inibenti di « sulforafene » (200 γ) non ha messo in evidenza alterazioni morfologiche degne di rilievo e che non vanno al di là delle comuni alterazioni rilevabili nei germi invecchiati in modo naturale (coartazione e distacco del protoplasma dalla membrana pericellulare) (figg. 13-14). Tali alterazioni sono dovute probabilmente alle condizioni di stasi metabolica nella quale si trovano i germi.

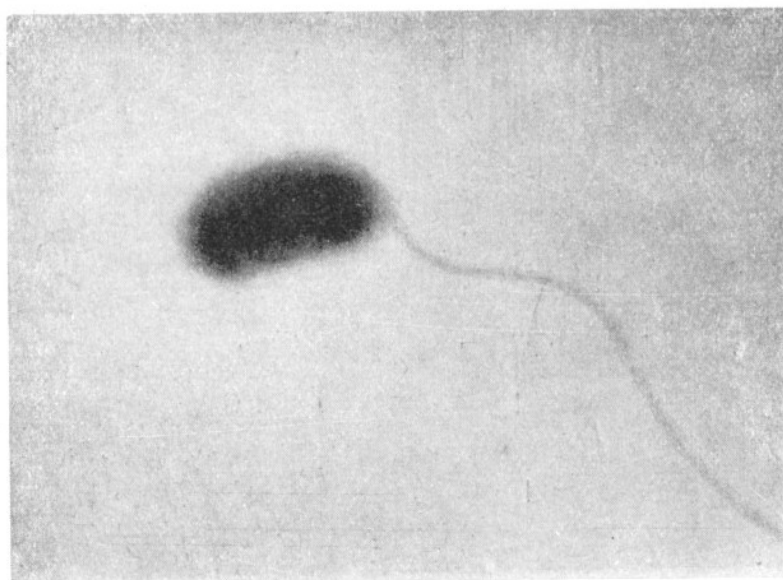


Fig. 7 — *V. Cholerae* visto
al microscopio elettronico
(20.000 ingrandimenti)

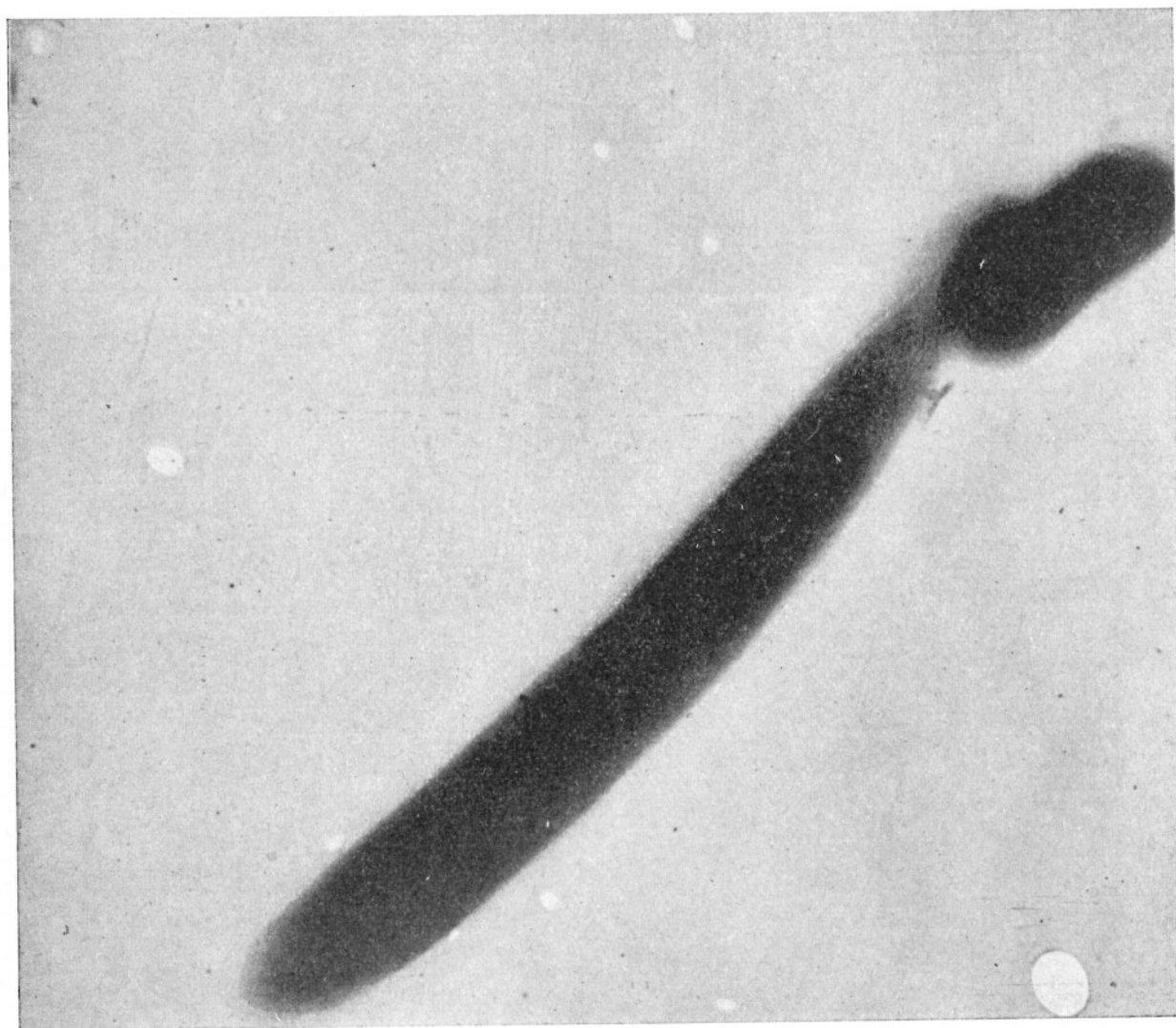


Fig. 8 — *V. Cholerae* - Dopo 6 h. di incubazione a 37° C senza aggiunta di dose sub-inibente di sulforafene. Si nota un individuo normale, a protoplasma compatto ed omogeneo, mentre non è visibile la membrana pericellulare. Il germe molto allungato presenta schiarimento bipolare dove s'intravede la membrana pericellulare (microscopio elettronico: 40.000 ingrand.)

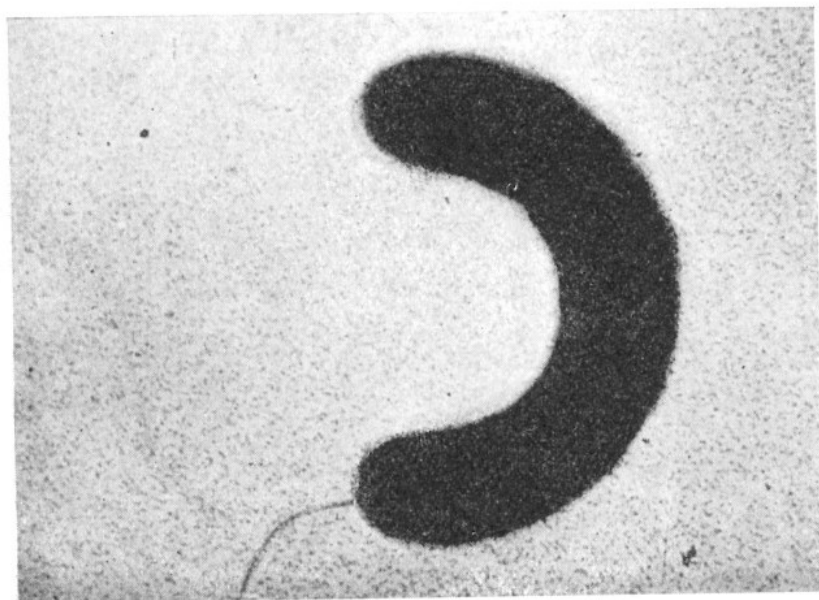


Fig. 9 — *V. Cholerae* - Coltura di 6 h. trattata con dose sub-inibente di sulfamonomethoxime. Individuo allungato ed ingrossato con protoplasma compatto ed omogeneo; la membrana pericellulare non è visibile mentre è bene evidente il ciglio (microscopio elettronico: 20.000 ingrandimenti)

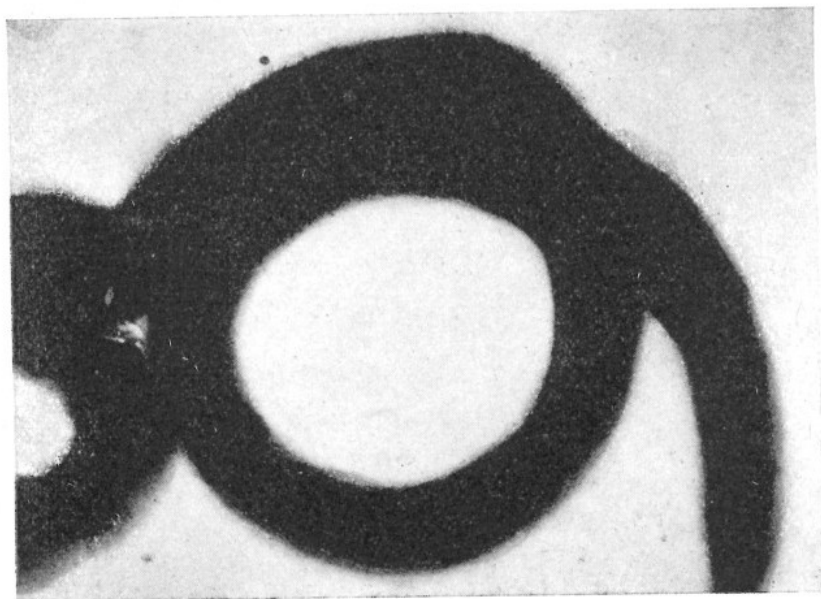


Fig. 10 — *V. Cholerae* - Colture di 12 h. trattate con dose sub-inibente di sulfamonomethoxime. Elementi allungati e ingrossati (forme giganti) a protoplasma compatto e omogeneo; non è visibile la membrana pericellulare (microscopio elettronico: 20.000 ingrandimenti)

Fig. 11 — *V. Cholerae* -
Cultura di 24 h. senza sul-
forafene. Individuo aumen-
tato di lunghezza a proto-
plasma omogeneo, a margini
irregolari e sfumati. S'intra-
vede la membrana pericel-
lulare (microscopio elettro-
nico: 20.000 ingrandimenti)

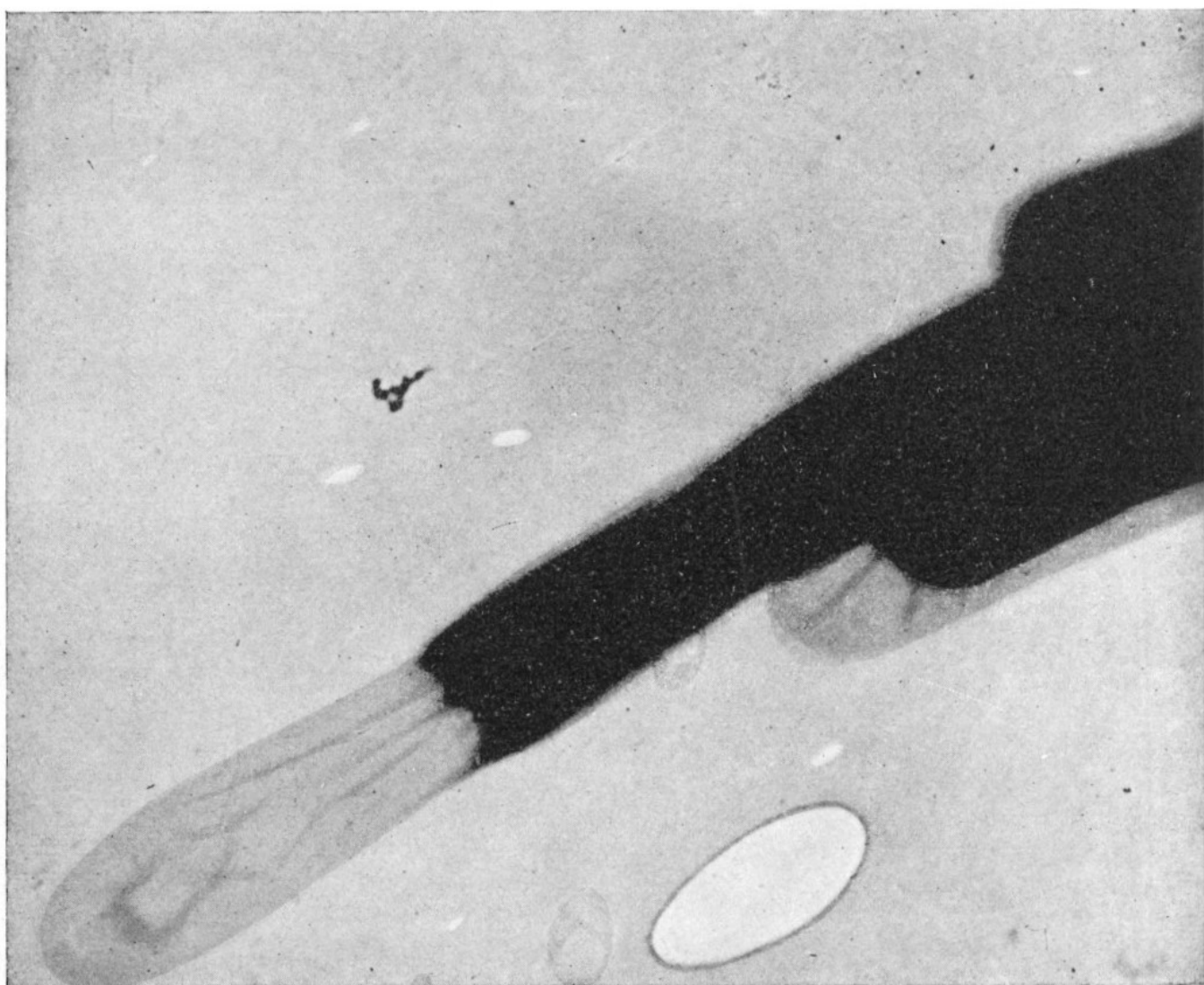
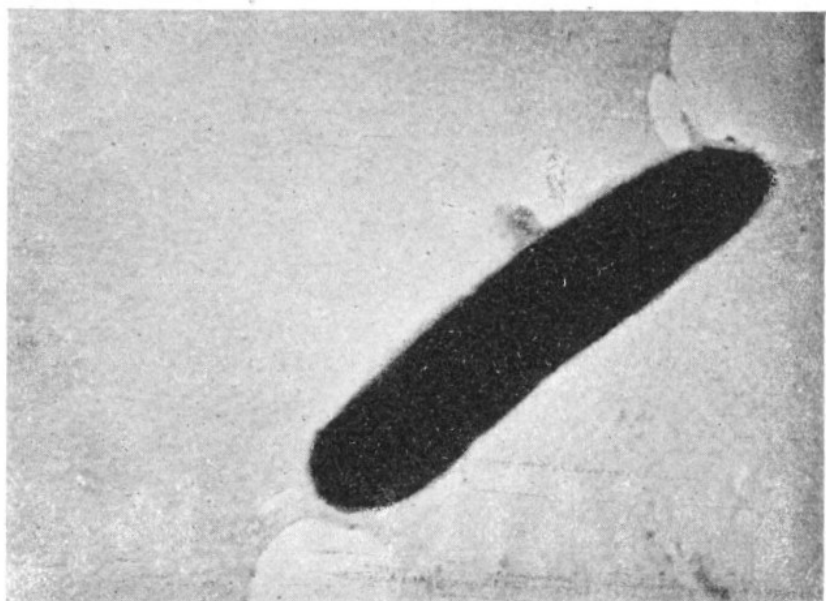


Fig. 12 — *V. Cholerae* - Coltura di 24 h. con aggiunta di dose sub-inibente di sulforafene. Individui allungati di cui un solo estremo è occupato da protoplasma addensato ed omogeneo, mentre l'altro polo batterico si presenta « svuotato » e attraversato da numerose lacinie che uniscono il protoplasma alla membrana pericellulare che è bene evidente (microscopio elettronico: 40.000 ingrandimenti)

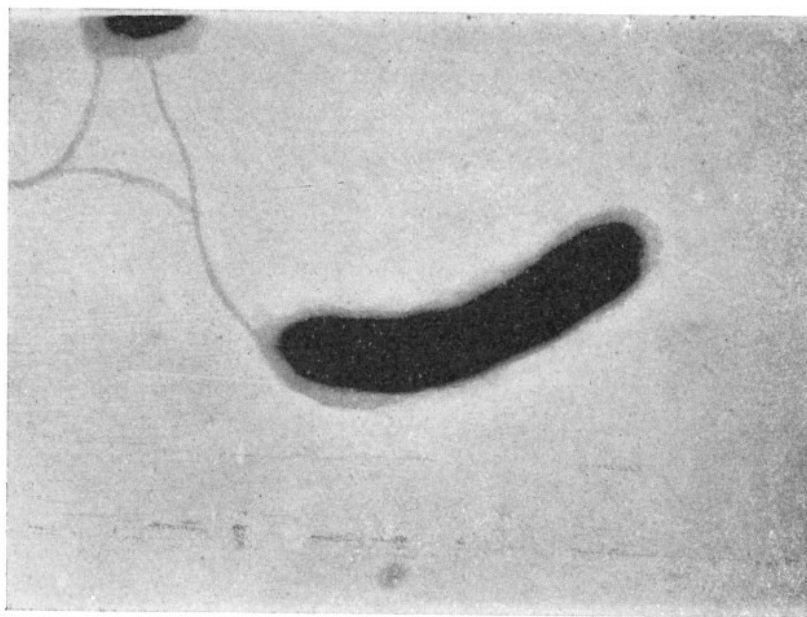


Fig. 13

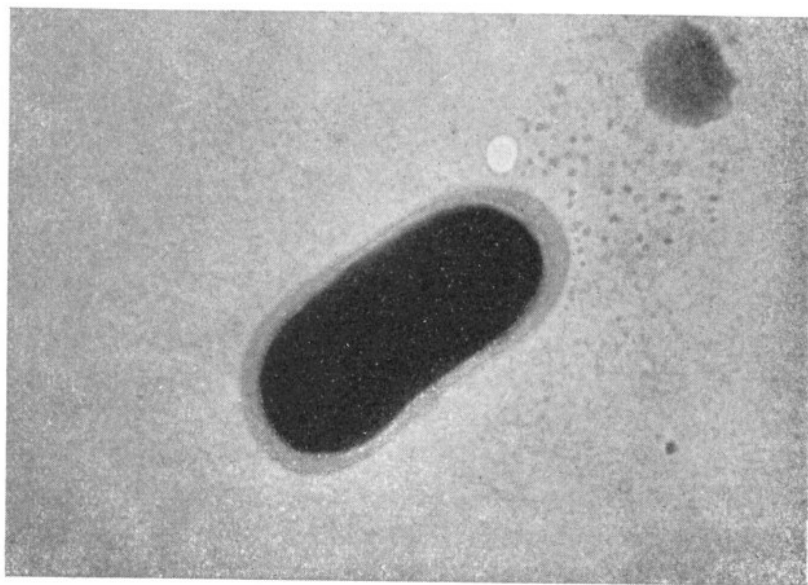


Fig. 14

V. Cholerae - Osservazione fatta dopo 24 h. di germi sospesi in soluzione fisiologica con aggiunta di sulforafene. Elementi in stasi metabolica con coartazione e distacco del protoplasma dalla membrana pericellulare (microscopio elettronico; 20.000 ingrandimenti)

CONCLUSIONI.

Da quanto sopra esposto si può concludere che dosi sub-inibenti di « sulforafene » (200 γ) agiscono — a mio avviso — in quanto modificano il processo di divisione batterica e possono perciò dimostrarsi attivi solo quando i germi effettivamente si dividono. Anche tale antibiotico apporterebbe quindi dei perturbamenti nel meccanismo della divisione batterica che giustificerebbero la comparsa delle forme così dette « giganti ». Molto probabilmente il « sulforafene » supererebbe la barriera opposta dalla membrana pericellulare all'atto della divisione o quando — mentre si prepara una divisione — il metabolismo tumultuoso del germe (« forme giganti » per ingrossamento protoplasmatico e distensione massima della membrana pericellulare) determinerebbe una diminuita selettività della membrana stessa.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) NEGRI R.: Rendiconti Ist. Sup. Sanità - vol. XI, parte IV, 990-993 (1948).
 - (2) NEGRI R., MUNTONI F., D'AMORE A.: Rendiconti Ist. Sup. Sanità (in corso di stampa).
 - (3) SCHMIDT e KARRER: Helv. 31, 1017 (1948).
 - (4) GARDNER A. D.: Nature 1940, 146, 837.
 - (5) SMITH L. D. e HAY T.: J. Franklin Hosp. 1942, 233, 598.
 - (6) BIGGER J. W., THOMAS G. E. e CALDWELL W. G. O.: J. Path. Bact. 1944, 56, 266.
 - (7) DUBOS R. J.: J.A.M.A. 1944, 124, 633.
 - (8) COGGI G.: Boll. Ist. Sier. Milanese, 1944, 23.
 - (9) CARLINFANTI E.: Clinica Nuova - 15-8-1945, vol. 1, n. 6, 7, 8; 176.
 - (10) MILLER, SCOTT e MOELLER: J.A.M.A. 1944, 125, 607.
 - (11) TURNER e STERNBERG: J.A.M.A. 1944, 124, 133.
 - (12) MONNIER J.: La pénicilline à la portée du praticien, 1946, 120.
 - (13) WAKSMAN S. A.: J. Bact. 45, 64, 1943.
 - (14) PENSO G., SCANGA F.: Rendiconti Ist. Sup. Sanità 1947.
-